

(12)特許協力条約に基づいて公開された国

10/528814

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年4月8日 (08.04.2004)

PCT

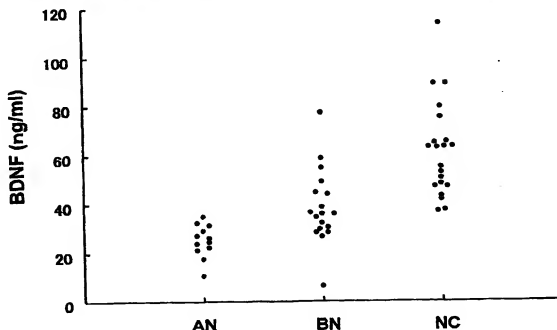
(10) 国際公開番号
WO 2004/029624 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/53, A61K 38/17, 45/00, A61P 43/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/012134
- (22) 国際出願日: 2003年9月24日 (24.09.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2002-277218 2002年9月24日 (24.09.2002) JP
- (71) 出願人 および
(72) 発明者: 伊豫 雅臣 (IYO, Masaomi) [JP/JP]; 〒262-0033 千葉県千葉市花見川区幕張本郷7丁目21番15号 Chiba (JP).
- (72) 発明者: および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 橋本 謙二 (HASHIMOTO, Kenji) [JP/JP]; 〒202-0013 東京都西
- 東京市 中町5丁目17番2号 Tokyo (JP). 中里 道子 (NAKAZATO, Michiko) [JP/JP]; 〒275-0017 千葉県習志野市 藤崎7丁目8番14号 Chiba (JP). 清水 栄司 (SHIMIZU, Eiji) [JP/JP]; 〒260-0856 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号千葉大亥鼻宿舍201 Chiba (JP). 小泉 裕紀 (KOIZUMI, Hiroki) [JP/JP]; 〒260-0002 千葉県千葉市中央区旭町18-18 7ビル 旭A-301 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 河宮 治, 外(KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号IMPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,

[続表有]

(54) Title: DIAGNOSTIC AND EXAMINATION METHOD FOR EATING DISORDER

(54) 発明の名称: 摂食障害の診断薬および検定方法



(57) Abstract: It is intended to provide a diagnostic for eating disorder which contains, as the active ingredient, an antibody against a brain-derived neurotrophic factor and a method of examining eating disorder which comprises measuring the concentration of the brain-derived neurotrophic factor in blood. Eating disorder can be easily diagnosed particularly by measuring the concentration of the brain-derived neurotrophic factor in the blood of a patient with the use of an antibody against the brain-derived neurotrophic factor and a labeled antibody against the brain-derived neurotrophic factor.

[続表有]

WO 2004/029624 A1



SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 抗脳由来神経栄養因子抗体を有効成分とする摂食障害の診断薬および血液中の脳由来神経栄養因子の濃度を測定することによる摂食障害の検定方法を提供する。特に、抗脳由来神経栄養因子抗体と標識化抗脳由来神経栄養因子抗体とを用いて患者血液中の脳由来神経栄養因子の濃度を測定することによって摂食障害の診断が容易に行われる。

明 細 書

摂食障害の診断薬および検定方法

5 技術分野

本発明は、摂食障害の診断薬および摂食障害の検定方法に関する。さらに詳しくは抗脳由来神経栄養因子抗体を主成分とすることを特徴とする摂食障害の診断薬、血液中の脳由来神経栄養因子の濃度を測定することを特徴とする摂食障害の検定方法、血液中の脳由来神経栄養因子の濃度を測定することを特徴とする摂食障害治療薬の検定方法、および脳由来神経栄養因子を増加させる化合物からなる摂食障害治療薬に関する。

背景技術

摂食障害である神経性無食欲症(拒食症：anorexia nervosa(AN))、および神経性大食症(bulimia nervosa(BN))は、それぞれ女性の0.5～3.7%および1.1～4.2%が、生涯のうちに罹患する疾患である。男性の罹患率は、女性の約10%であると言われている。主として、思春期・青年期の女性に多く、痩せを希求する心理が著明である。我が国の摂食障害は近年増加しており、1980年からの20年間に約10倍の増加が見られる。神経性無食欲症の主な症状として、無食欲、やせ、無月経などがあり、神経性無食欲症の特徴は、正常体重の最低限の維持を拒否することである。神経性大食症の主な症状として、「気晴らし食い」と呼ばれる過食行動を頻繁に繰り返す行動、過食直後に嘔吐あるいは下剤を乱用する不適切な代償行動などが見られる。このように両者は全く正反対の病態のように見えるが、神経性無食欲症が数カ月後に神経性大食症へと症状変遷したり、逆に、神経性大食症がしばしば神経性無食欲症のような症状を呈することがある。つまり、神経性無食欲症と神経性大食症は全く別の疾患ではなく、相互に移行したり重複したりするような病態であり、その患者は非常に多様でその病像も複雑である。体型と体重への認知の障害は、神経性無食欲症および神経性大食症の本質的な特徴である。

例えば、セロトニンは視床下部内側部の摂食停止機構に作用して、特に炭水化物の摂取抑制をする。神経性大食症では高エネルギー食に対する強い嗜好や1回摂取量の著明な増加を示しており、セロトニン神経系の異常が強く示唆されている。食行動異常においては脳内過程だけでなく、末梢レベルでも摂食調節機構の破綻が認められている。コレシストキニンは末梢性の満腹信号物質で、迷走神経を介して中枢に伝えられ摂食を中止させる。神経性無食欲症ではコレシストキニンの食事負荷時の過剰応答が観察され、逆に神経性大食症ではこの食事性応答が消失していると考えられている。またコレシストキニンの中枢系への信号伝達は、セロトニン神経系を介することが動物実験より分かっており、セロトニン神経系の機能異常に関連してこの伝達過程に障害が生じている可能性が指摘されている。神経性無食欲症や神経性大食症などの疾患では、摂食障害以外にも多彩な精神身体症状がある。その原因解明のため、脳脊髄液や血液中の摂食調節物質の動態が調べられているが、多くは摂食異常の結果として2次的に起こる反応であり、その動態を引き起こすような変化を示すものは限られている。

このような神経性無食欲症や神経性大食症などの摂食障害の診断には、血液や尿などの患者のサンプルを用いた研究が報告されているが、未だに確立されたものは無い。病態の特殊性から早期診断、治療、社会復帰活動、再発予防といった包括的な治療体系の確立が望まれている。摂食障害の治療には、薬物治療、認知行動療法、集団行動療法などが用いられている。薬物治療としては、抗うつ薬などが用いられている(例えば、マサンド、P Sら著、Selective serotonin-reuptake inhibitors: an update.、Harvard Rev Psychiatry (1997) 7: 69-84; およびカイヤ Wら著、Serotonin neuronal function and selective serotonin reuptake inhibitor treatment in anorexia and bulimia nervosa.、Biol Psychiatry (1998) 44: 825-38を参照)。

脳由来神経栄養因子(以下、BDNFと略称する)は、脳内で発見された神経栄養因子の一つであり、脳内神経回路網の形成や発達、さらにはその生存維持に重要な役割を果たしていることが判明している。さらに1990年代後半には、BDNFはシナプスの可塑性にも関与し、記憶や学習にも重要な役割を果たしていることが知られており、また神経細胞死に対して神経保護作用も有する事が報告

されている。セロトニン取り込み阻害薬などの抗うつ薬の慢性投与により、ラット海馬におけるBDNFの量が増加することが示唆されており、BDNFとセロトニン神経系との関係も指摘されている。最近の遺伝子改変動物を用いた研究より、BDNFは摂食行動にも関与している事が示唆されている(例えば、ライオンズ、WEら著、Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities.、Proc Natl Acad Sci USA (1999) 96: 15239-15244を参照)。しかしながら、摂食障害の患者におけるBDNFの役割等については報告が無い。

神経性無食欲症および神経性大食症は、前述したとおり、近年、急増している疾患であるが、その症状は一見すると相反する病態であり、また多様で複雑であるため、その診断が困難であり、早期に適切な処置を講じることができず、そのことが症状をさらに悪化させる原因になっている。従って、医療の現場から摂食障害の早期に診断するような診断薬、診断方法、治療薬および治療薬の検定方法の開発が望まれている。

発明の開示

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行なった結果、摂食障害の患者の血清中BDNFのレベルが、健常者のそれと比較して有意に低下していることを見出し、その違いを利用することにより、抗脳由来神経栄養因子抗体(以下、「抗BDNF抗体」という)を用いて摂食障害の診断が可能となることを知った。本発明にかかる知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明は下記の態様の発明を提供するものである。

1. 抗BDNF抗体を主成分とすることを特徴とする摂食障害診断薬。
2. 患者の血液中のBDNFの濃度を測定するための上記1に記載の摂食障害診断薬。
3. 抗BDNF抗体および標識化抗BDNF抗体を含む上記1または2に記載の摂食障害診断薬。
4. 抗BDNF抗体および標識化剤を主成分とすることを特徴とする摂食障害の診断キット。

5. 患者の血液中のBDNFの濃度を測定するための上記4に記載の摂食障害の診断用キット。

6. 抗BDNF抗体および標識化抗BDNF抗体を含む上記4または5に記載の摂食障害の診断キット。

5 7. 動物の血液中のBDNFの濃度を測定することを特徴とする摂食障害の検定方法。

8. 抗BDNF抗体を用いてBDNFの濃度を測定する、上記7に記載の摂食障害の検定方法。

10 9. 抗BDNF抗体および標識化抗BDNF抗体を用いてBDNFの濃度を測定する上記7に記載の摂食障害の検定方法。

10. 動物の血液中のBDNFの濃度を測定することを特徴とする摂食障害の治療薬の検定方法。

11. BDNFを増加させる化合物からなる摂食障害の治療薬。

12. BDNFからなる摂食障害の治療薬

15

図面の簡単な説明

第1図は正常対照(NC)、神経性大食症(BN)および神経性無食欲症(AN)の患者における血清BDNF濃度の散布図である。

20 第2図は全被験者における血清BDNF値と血清BMI値の間の相関関係を示す。

第3図は全被験者における血清BDNF値とHDRSスコアとの間の相関関係を示す。

第4図はすべての対象におけるHDRSスコアとBITEスコアの間の関係を示す。

25 第5図はBDNF注射と生理食塩水注射の場合のマウスにおける一日あたりの摂餌量を比較したグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の摂食障害診断薬、診断キット、摂食障害の検定方法、摂食障害治療薬

およびその検定方法について以下に詳細に説明する。

本明細書における用語の意味あるいは定義は以下のとおりである。

「抗脳由来神経栄養因子抗体(抗BDNF抗体)」とは、BDNFを抗原として用いて精製された抗体をいう。該抗体は、BDNFに結合する能力があればよく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体を含む。また好ましいものとしては、特異的にBDNFに結合するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体等が挙げられる。

「標識化抗脳由来神経栄養因子抗体(標識化抗BDNF抗体)」とは、抗BDNF抗体をペルオキシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素等の酵素、デルフィニウム等の蛍光標識、放射性同位元素標識または同位元素標識、ビオチン等を結合させ、BDNFを定量化できるように工夫された抗体をいう。更に、「標識化抗BDNF抗体」には、ビオチン、2,4-ジニトロフェノール等で修飾した抗BDNF抗体も含まれる。この際には、該標識化抗BDNF抗体に標識化したアビジン、標識化抗2,4-ジニトロフェノール抗体を更に用いて定量化できる。

「摂食障害」とは神経性無食欲症および神経性大食症を含み、思春期・青年期の女性に多く、食行動の重篤な障害である。神経性無食欲症の特徴は、正常体重の最低限の維持を拒否することであり、神経性大食症の特徴は、無茶食いエピソードの繰り返しと、それに付随する自己誘発性嘔吐や下痢・利尿剤・他の薬剤の乱用、絶食、過度な運動などの不適切な代償行動である。体型と体重への認知の障害は、神経性無食欲症および神経性大食症の本質的な特徴である。

本発明による摂食障害の診断は、例えば次のようにして行なうことが出来る。ヒトの血液から血清を調製し、血清中のBDNFの量を種々の方法により定量する。望ましくはBDNFに対して特異性の高い抗体を用いたサンドイッチELISAによってBDNFを検出・定量する。摂食障害の血清中のBDNFの濃度が、健常者の値より有意に低いことを利用し、摂食障害を診断する。

具体的な血清中のBDNFを測定する方法としては、例えば

1. ポリスチレン、ナイロン、ガラス、シリコンラバー、セファロース等の固相に抗BDNF抗体を固定する工程；

2. 診断する患者の血清を固相に加える、または接触させる工程；
3. 固相を洗浄する工程；
4. 標識化された抗BDNF抗体を加える、または接触させる工程；
5. 該標識を用いてBDNFの量を測定する工程；

5 からなる方法等が挙げられる。

更に、具体的な血清中のBDNFを測定する方法としては、例えば、

1. ポリスチレン、ナイロン、ガラス、シリコンラバー、セファロース等の固相に抗BDNF抗体を固定する工程；
2. 診断する患者の血清を固相に加える、または接触させる工程；
- 10 3. 固相を洗浄する工程；
4. ビオチンまたは2, 4-ジニトロフェノールで修飾した抗BDNF抗体を加える、または接触させる工程；
5. 標識化アビジンまたは標識化2, 4-ジニトロフェノール抗体を加える、または接触させる工程；

15 6. 該標識を用いてBDNFの量を測定する工程；
からなる方法等が挙げられる。

更に、具体的な血清中のBDNFを測定する方法としては、例えば、

1. ポリスチレン、ナイロン、ガラス、シリコンラバー、セファロース等の固相に抗BDNF抗体を固定する工程；
- 20 2. 診断する患者の血液を固相に加える、または接触させる工程；
3. 固相を洗浄する工程；
4. ビオチンで修飾した抗BDNF抗体を加える、または接触させる工程；
5. 標識化アビジンを加える、または接触させる工程；
6. 該標識を用いてBDNFの量を測定する工程；

25 からなる方法等が挙げられる。固相の形状として小球、ウェル、試験管等が挙げられる。

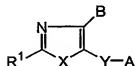
抗原またはELISAのスタンダードとして用いられるBDNFは市販されているか、または以下の方法で調製することができる。遺伝子工学的手法を用いる場合、BDNFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適切な

宿主に挿入して形質転換し、この形質転換の培養上清から目的とする組換えBDNFを得ることができ、均質な多量のBDNFの生産に好適である。上記宿主細胞は特に限定されず、従来から遺伝子工学的手法で用いられている各種の宿主細胞、例えば大腸菌、枯草菌、酵母、植物または動物細胞を用いることができる。

- 5 抗BDNF抗体は、BDNFを抗原として、ウサギ、ニワトリ、シチメンチョウなどに免疫することにより調製される。標識化抗BDNF抗体は、抗BDNF抗体をビオチン化試薬や架橋剤付きペルオキシダーゼの市販されているキットを用いて反応させ、調製することができる。

- 10 本発明方法は、また摂食障害の治療薬の判定にも有用である。すなわち、BDNFを増加させる作用を有する化合物は、摂食障害の治療薬として有用である可能性がある。また、BDNFの量が低いモデル動物(マウスやラットなど)は、摂食障害の動物モデルとしても有用である。従って、この検定方法を利用することにより、新しい摂食障害の治療薬のスクリーニングも行なうことが可能である。

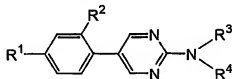
- 15 このような方法で見出される治療薬には、非経口的または経口的に投与できる薬物が含まれ得る。摂食障害の治療薬としては、BDNF自身の他、下記式：



(式中、R¹は置換されていてもよい複素環基等、Aは置換されていてもよいヒドロキシ基等、Bは置換されていてもよい芳香族基、Xは酸素原子等、Yは2価の炭化水素基等を示す)

- 20 で示されるアゾール誘導体(特開平2001-131161)が例示される。

また、下記式：



(式中、R¹およびR²はそれぞれハロゲン原子であり、R³およびR⁴はそれぞれ水素原子、炭素原子数1～5のアルキル基、炭素原子数1～3のアルキルスルフォニル基またはアセチルアミノアルキル基である)

で表される 5-フェニルピリミジン化合物およびその塩（特開平8-3142）が例示される。

さらに、カテコール誘導体 (Furukawa, Y., J. Biol. Chem., 261巻, 6039頁 (1986年)、特開昭63-83020、特開昭63-156751、特開平2-53767、特開平2-104568、特開平2-149561、特開平3-99046、特開平3-83921、特開平3-86853、特開平5-32646)、キノン誘導体 (特開平3-81218、特開平4-330010、特開平7-285912)、グルタミン酸誘導体 (特開平7-228561)、不飽和脂肪酸誘導体 (特開平8-143454)、オイデスマン誘導体 (特開平8-73395)、縮環系オキサゾール誘導体 (特開平8-175992)、カルバゾール誘導体 (特開平8-169879)、インドール誘導体 (特開平7-118152、特開平8-239362)、天然物由来のテルペン誘導体 (特開平7-149633、特開平8-319289)、プリン誘導体であるレテプリニム (NeuroTherapeutics社、米国) などが挙げられる。

これらの化合物のうち、2-アミノ-5-(2,4-ジクロロフェニル)ピリミジン (Biochemical Pharmacology 66 (2003) 1019-1023) および 4-(4-クロロフェニル)-2-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)-5-[3-(2-メトキシフェノキシ)プロピル]-1,3-オキサゾール (Chem. Pharm. Bull. 51(5) 565-573 (2003)) が好ましい。

これら摂食障害治療薬の正確な投与量および投与計画は、個々の治療対象毎の所要量、治療方法、疾病または必要性の程度、および薬物の種類によって異なり、また当然医師の判断による必要がある。例えば、BDNFの場合について言えば、経口的投与する場合の投与量、投与回数は症状、年齢、体重、投与形態等によって異なるが、例えば注射剤として皮下または静脈に投与する場合、成人の患者の体重 1 kg、一日当たり約 0.1 mg ~ 約 2500 mg の範囲、好ましくは約 1 mg ~ 約 500 mg の範囲から投与量が選択され、例えば噴霧剤として気管に投与する場合、成人の患者の体重 1 kg、一日当たり約 0.1 mg ~ 約 2500 mg の範囲、好ましくは約 1 mg ~ 約 500 mg の範囲から投与量が選択される。投与計画としては、連日投与または間欠投与またはその組み合わせがある。経口的投与する場合の投与量、投与回数は症状、年齢、体重、投与形態等によって異なるが、例えば、成人の患者の体重 1 kg、一日当たり約 0.5 mg ~ 約 2500 mg の範囲、好ましくは約 1 mg ~ 約 1000 mg の範囲から投与

量が選択される。

本発明の方法で得られる摂食障害の治療薬を薬学的に許容しうる非毒性の担体と混和することにより医薬組成物を製造することができる。このような組成物を、非経口投与用(皮下注射、筋肉注射、または静脈注射)に調製する場合は、特に溶液剤形または懸濁剤形がよく、膣または直腸投与用の場合は、特にクリームまたは坐薬のような半固形型剤形がよく、経鼻腔投与用の場合、特に粉末、鼻用滴剤、またはエアロゾル剤形がよい。

組成物は一回量投与剤形で投与することができ、また例えばレミントンの製薬科学(マック・パブリッシング・カンパニー、イーストン、PA、1970年)に記載されているような製薬技術上良く知られているいずれかの方法によって調製できる。注射用製剤は医薬担体として、例えば、アルブミン等の血漿由来蛋白、グリシン等のアミノ酸、マンニトール等の糖を加えることができる。注射剤形で用いる場合には更に緩衝剤、溶解補助剤、等張剤等を添加することもできる。また、水溶液剤、凍結乾燥剤として使用する場合、凝集を防ぐためにTween 80(登録商標)、Tween 20(登録商標)などの界面活性剤を添加するのが好ましい。また注射剤以外の非経口投与剤形は、蒸留水または生理食塩液、ポリエチレングリコールのようなポリアルキレングリコール、植物起源の油、水素化したナフタレン等を含有してもよい。例えば坐薬のような膣または直腸投与用の製剤は、一般的な賦形剤として例えばポリアルキレングリコール、ワセリン、カカオ油脂等を含有する。膣用製剤では、胆汁塩、エチレンジアミン塩、クエン酸塩等の吸収促進剤を含有しても良い。吸入用製剤は固体でも良く、賦形剤として例えばラクトースを含有してもよく、また経鼻腔滴剤は水または油溶液であつてもよい。

実施例

以下に、本発明の実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

実施例 1

(1)被験者

後記表 1 に示す神経性大食症の女性患者 18 名(平均年齢: 21.6 歳(標準偏

差4.0)、年齢範囲:16歳~34歳)および神経性無食欲症の女性患者12名(平均年齢:19.6歳(標準偏差5.9)、年齢範囲:14歳~34歳)、ならびに同一年齢層の健康者(平均年齢:21.6歳(標準偏差1.7)、年齢範囲:20歳~25歳)も正常対照として被験者を選んだ。神経性大食症または神経性無食欲症のすべての患者は「精神障害の診断と統計マニュアルIV」(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV:DSM-IV;アメリカ精神医学会)に従って診断し、神経性無食欲症の患者は2つのサブタイプ、制限型(Restricting Type)(n=7)、および無茶食い/排出型(Binge-Eating/Purging Type)(n=5)、に分類した。実験対象すべてに対しBITE(the Bulimic Investigatory Test, Edinburgh)と17項目ハミルトンうつ病評価尺度(HDRS)(Br. J. Soc. Clin. Psychol. 6:278-296 (1967))を付した。BITEは33項目自己申告性アンケート(self-report questionnaire)であり、神経性大食症や無茶食い/排出型の症状の対象を識別するための多様な設定に利用できるか否かの客観的スクリーニングとしてデザインされている。臨床上有意の限界尺度は症状スコアが20あるいはそれ以上である(ヘンダーソンら、(1987) A self-rating scale for bulimia. The 'BITE'. Bri J Psychiatry 150: 18-24)。17項目HDRSは抑鬱症候学(depressive symptomatology)の測定に用いた。体重と身長および肥満度指数(BMI:kg/m²)を測定した。神経性無食欲症および神経性大食症の患者の罹患期間はそれぞれ平均1.8年(標準偏差1.7)および3.8年(標準偏差2.5)であった。治療の為に投与した抗精神病薬は、神経性大食症の患者にはリスペリドン(risperidone、4mg/日;n=1)、フルボキサミン(flvoxamine、50-150mg/日;n=4)、パロキセチン(paroxetine、20mg/日;n=1)、トラゾドン(trazodone、25mg/日;n=1)、および神経性無食欲症の患者にはパロキセチン(paroxetine、20-30mg/日;n=2)、リスペリドン(risperidone、1mg/日;n=1)であった。患者中、20患者は投薬治療を行っていなかった。

(2)実験方法

被験者の血清検体を採取し、測定まで-80℃で保存した。BDNFの血清レベルはBDNF測定キット(プロメガ社、米国)を用い、製造者の指示に従って測

定した。すなわち、抗BDNFモノクロナル抗体を96穴プレートにコーティングし、4℃で18時間インキュベーションした。プレートをブロッキング緩衝液にて室温で1時間ブロッキング処理した。緩衝液で洗浄した後、希釈した血清1000μLを添加した。定量用のスタンダードとして、ヒトBDNF(78-5000 pg/mL)を添加したものを用いた。室温で2時間反応させた後、緩衝液で5回洗浄し、抗ヒトBDNF抗体を添加し室温で2時間反応させた。緩衝液で5回洗浄した後、抗ワサビペルオキシダーゼ標識IgY抗体(100μL)を添加し、室温で1時間反応させた。次に、緩衝液で5回洗浄した後、TMB溶液(100μL)を添加し、室温で10分間反応させた後、停止液(1M塩酸:100μL)を添加して反応を止め、30分以内に450nm波長での吸光度を自動マイクロプレートリーダー(Emax、モレキュラーデバイス、米国)で測定した。検体中のBDNFの含量をサンドイッチ型ELISA法にて測定し、検量線からそのBDNFの濃度を算出した。

(3)統計分析

データは平均値±標準偏差で示した。3群の差は一元配置分散分析(ANOVA)で解析した。治療方法間の多重比較のため、ボンフェロニ・ダンテテストを行った。2群間の統計分析はスチューデントt-テストを用いて行った。変数間の関係はピアソンの積率相関係数で確認した。0.05以下のp値は統計的に有意とした。

(4)結果

表1に被験者の特徴および上記実験結果を示す。

表 1

	NC (N=21)	AN (N=12)	BN (N=18)	p
年齢(歳)	21.3 (1.71)	19.6 (5.89)	21.6 (3.97)	NS
罹患期間(年)		1.76 (1.33)	3.72 (2.36)	0.013*
体重(kg)	50.8 (4.60)	38.1 (4.55)	50.4 (4.96)	<0.0001**
BMI(kg/m ²)	20.0 (1.54)	15.3 (1.84)	20.4 (2.09)	<0.0001**
BDNF(ng/ml)	61.4 (19.5)	24.9 (6.75)	38.4 (15.3)	<0.027*, <0.0001*, <0.0001**
BITE 症状尺度	5.86 (5.94)	17.25 (7.45)	23.78 (2.73)	0.003*, <0.0001*, <0.0001**
BITE 重症度尺度	1.90 (3.77)	7.08 (5.55)	12.3 (6.49)	0.011*, <0.0093*, <0.0001**
17 項目 HDRS	7.67 (6.14)	18.25 (6.11)	19.39 (6.03)	<0.0001*, <0.0001**

NC=正常対照; AN=神経性無食欲症; BN=神経性大食症

BMI=肥満度指数;

BDNF=脳由来神経因子;

BITE=過食症検査試験、エジンバラ;

17 項目 HDRS=17 項目ハミルトンうつ病評価尺度

値は平均値(SD)

NS=有意ではない

p=AN と BN 間の比較; p*=AN と NC 間の比較; p**=BN と NC 間の比較

i) 全被験者における血清BDNFの濃度

正常対照(NC)、神経性大食症(BN)および神経性無食欲症(AN)の被験者における血清BDNF濃度の散布状態を第1図に示す。

一元ANOVAは3群間の有意差($F=22.33$ [2, 48], $p<0.000$)を示し、ボンフェロニ・ダンテストは、正常対照でのBDNF血清レベル(平均値: 61.4 ng/ml [標準偏差: 19.5])はBN患者(平均値: 38.4 ng/ml [標準偏差: 15.3], $p<0.0001$)やAN患者(平均値: 24.9 ng/ml [標準偏差: 6.75], $p<0.0001$)よりも有意に高いことが判明した。BN患者のBDNF血清レベルは有意に($p=0.027$)AN患者より大きかった。3群間の年齢による差は見られなかった(表1)。無茶食い/排出型AN患者($n=5$)のBDNF血清レベル(平均値: 27.82 ng/ml [標準偏差: 6.76])は制限型AN患者($n=7$)のBDNF血清レベル(平均値: 22.83 ng/ml [標準偏差: 6.39])とは有意に違わなかった(スチューデントt-テスト、 $p=0.222$)。すべての群($n=51$)を総合して、血清BDNF値と年齢間に有意な相関($r=0.079$, $p=0.585$)はなかった。すべての患者($n=30$)において、血清BDNF値と罹患期間の間に有意な相関($r=0.04$, $p=0.836$)はなかった。

ii) 血清BDNFと血清BMI

全被験者の血清BDNF値と血清BMI値の相関関係を第2図に示す。

一元ANOVAは3群間($F=32.76$ [2, 48], $p<0.0001$)に有意な差を示し、ボンフェロニ・ダンテストは正常対照のBMI値(平均値: 20.01 kg/m^2 [標準偏差: 1.54])がAN患者の値(平均値: 15.33 kg/m^2 [標準偏差: 1.84])に比べて有意に高いこと、しかし正常対照とBN患者(平均値: 20.36 kg/m^2 [標準偏差: 2.09])の間には有意な差はないことを示した。すべての群($n=51$)を総合して、血清BDNF値とBMIの間に有意な正相関($r=0.378$, $p=0.006$)があった(第2図参照)。さらに、血清BDNF値とBMIの間にも有意な正相関($r=0.396$, $p=0.030$)がすべての患者($n=30$)で見られた。しかしながら、すべての群($n=51$)を総合して、BMIと年齢間には有意な相関($r=-0.044$, $p=0.7$)

61)はなかった。したがって、未投薬患者の血清BDNF値は投薬治療されたAN患者(スチューデントt-テスト、 $p=0.222$)および投薬治療されたBN患者(スチューデントt-テスト、 $p=0.230$)と違いはなかったことが判明した。

5 iii) 血清BDNF値と臨床評価尺度の比較

iii-1) BITEと17項目HDRS

表1に示す3群のBITEと17項目HDRSスコアにみられるように、一元ANOVAは3群間の有意差($F=53.30$ [2, 48], $p<0.0001$)を示し、ボンフェロニ・ダンテストは正常対照のBITE値(平均値: 5.86 [標準偏差: 5.94])はAN患者の値(平均値: 17.25 [標準偏差: 7.45])やBN患者の値(平均値: 23.78 [標準偏差: 2.73])に比べて有意に低いこと($p<0.0001$)を示した。BN患者のBITEスコアはAN患者の値と比べて有意に高かった($p=0.003$)。すべての群($n=51$)を総合して、BITEスコアと年齢間に有意な相関はなかった($r=-0.078$, $p=0.58$ 5)。

さらに、全被験者におけるBITEスコアとHDRS間の相関関係を第4図に示す。第4図に示されるように、有意な正相関($r=0.782$, $p<0.0001$)があった。

iii-2) 血清BDNFと17項目HDRSスコア

20 全被験者の血清BDNF値と、HDRSスコアとの相関関係を第3図に示す。すべての被験者($n=51$)においてHDRSと血清BDNF値の間に有意な負相関($r=-0.447$, $p=0.001$)が認められた。

一元ANOVAは3群間の有意な差異($F=21.23$ [2, 48], $p<0.0001$)を示し、ボンフェロニ・ダンテストは、正常対照の17項目HDRS値(平均値: 7.67 [標準偏差: 6.14])が、AN患者の値(平均値: 18.25 [標準偏差: 6.11])やBN患者の値(平均値: 19.39 [標準偏差: 6.03])と比べて有意($p<0.0001$)に高かった。

上記実験結果に見られるように、摂食障害(ANおよびBN)の女性患者の血清BDNF値は同一年齢層の女性正常対照の値と比べて有意に減少しており、また

AN患者の血清BDNF値はBN患者の値と比べて有意に低いことがわかった。血清BDNF値はHDRSスコア、抑鬱症状の測定、と反比例して相関していることも明白である。また、すべての被験者において、血清BDNF値とBMI値の間に有意な相関があった。しかしながら、正常BMI値であるBN患者の血清BDNF値は正常対照の値に比べて有意に低く、これは低下した血清BDNF値は減少したBMI値によるものではないことを示唆している。総合すれば、減少した血清BDNF値は摂食障害の病態生理学に寄与しているものと考えられる。

摂食障害の主たる行動上の異常は摂食量の調節における機能不全、例えば制限、過食、排出である。上記実験の摂食障害の患者はそのBMI値とBITEスコアで代表される異常な行動を示した。上記実験において、BMIとBITEに対するBDNF値に関して、BNとANの間に差異があったが、それは動物実験では予測出来なかった。低下したBDNF値は、無茶食いおよび排出行動および摂食障害の体重調節における維持機能を伴うことが可能である。一方、体重が増加すると、彼らは往々にして不安になり、過剰反応する。よって、体重の減少は原因ではなく低下したBDNF値に伴う摂食異常行動の結果である。

要するに、本実験により、BDNFは摂食障害(ANおよびBN)の病態生理学において極めて重要な役割を果たし、血液BDNFは摂食障害の生物学的マーカーとして有用であろう。

実施例 2

20週齢の雄性のBDNF(+/-)ヘテロマウス(米国ジャクソン社より購入したマウスをもとに千葉大学にて自家繁殖した)を使用した。1匹にリコンビナントヒトBDNF(40mg/kg、0.3mlの生食に溶解)を投与し、もう1匹に生理食塩水(0.3ml)を1日1回5日間皮下注射し、24時間の摂餌量をマウス摂餌量測定装置(メルクエスト社、富山)を用いて測定した。その結果を第5図に示す。

第5図に示すように、BDNF(+/-)ヘテロマウス(BDNFの量は野生型の約50%)にBDNFを投与したマウスは、生理食塩水を投与したマウスと比較して、一日あたりの摂餌量が抑制されることが分かった。

本結果より、BDNFの投与により、BDNF(+/-)ヘテロマウスの異常な

摂餌量が減少することが判った。すなわちBDNFを補充することにより、異常な摂食行動が改善されることが示唆された。このようにBDNF、BDNFの誘導体やBDNFを増加させる作用を有する薬剤により、摂食障害患者の異常な摂餌量の摂取(過食など)が抑制され、摂食障害の治療効果が期待できる。さらには、BDNF遺伝子治療により、摂食障害の患者の新しい治療法を提供することが予想される。

産業上の利用可能性

抗BDNF抗体を有効成分とする摂食障害の診断薬であって、該抗体を用いて血液中のBDNFを測定することによって、摂食障害が診断される。特に、抗BDNF抗体と標識化抗BDNF抗体とを用いて患者血液中のBDNFの濃度を測定することによって該診断が容易に行われる。

請 求 の 範 囲

1. 抗脳由来神経栄養因子抗体を主成分とすることを特徴とする摂食障害診断薬。

2. 患者の血液中の脳由来神経栄養因子の濃度を測定するための請求項 1 に記載の摂食障害診断薬。

3. 抗脳由来神経栄養因子抗体および標識化抗脳由来神経栄養因子抗体を含む請求項 1 または 2 に記載の摂食障害診断薬。

4. 抗脳由来神経栄養因子抗体および標識化剤を主成分とすることを特徴とする摂食障害の診断キット。

5. 患者の血液中の脳由来神経栄養因子の濃度を測定するための請求項 4 に記載の摂食障害の診断用キット。

6. 抗脳由来神経栄養因子抗体および標識化抗脳由来神経栄養因子抗体を含む請求項 4 または 5 に記載の摂食障害の診断キット。

7. 動物の血液中の脳由来神経栄養因子の濃度を測定することを特徴とする摂食障害の検定方法。

8. 抗脳由来神経栄養因子抗体を用いて脳由来神経栄養因子の濃度を測定する請求項 7 に記載の摂食障害の検定方法。

9. 抗脳由来神経栄養因子抗体および標識化抗脳由来神経栄養因子抗体を用いて脳由来神経栄養因子の濃度を測定する請求項 7 に記載の摂食障害の検定方法。

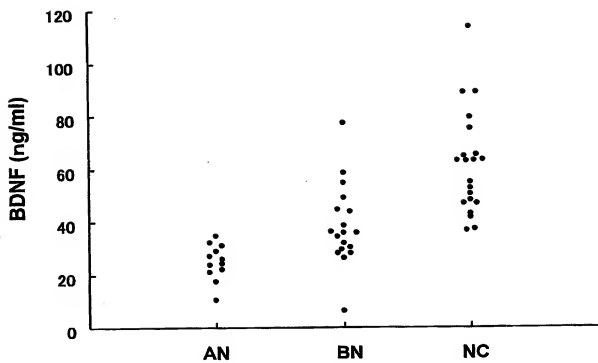
10. 動物の血液中の脳由来神経栄養因子の濃度を測定する摂食障害の治療薬の検定方法。

11. 脳由来神経栄養因子を増加させる化合物からなる摂食障害の治療薬。

12. 脳由来神経栄養因子からなる摂食障害の治療薬。

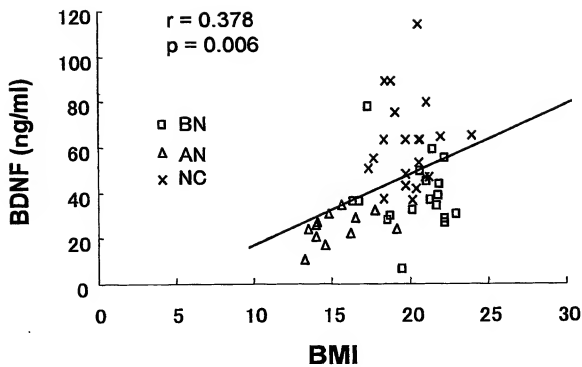
1/5

第1図



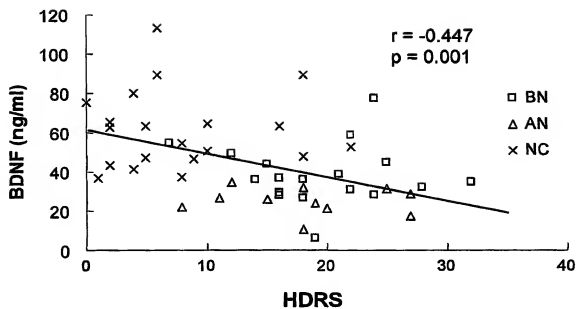
2/5

第2図



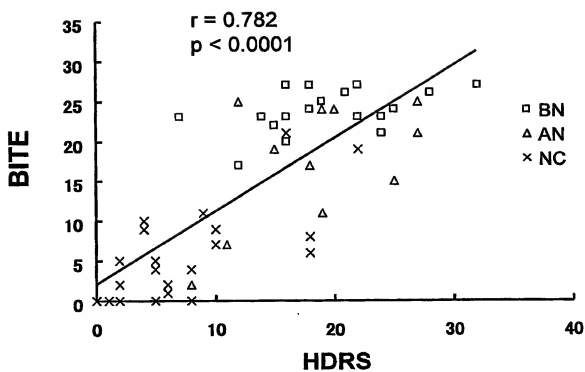
3/5

第3図



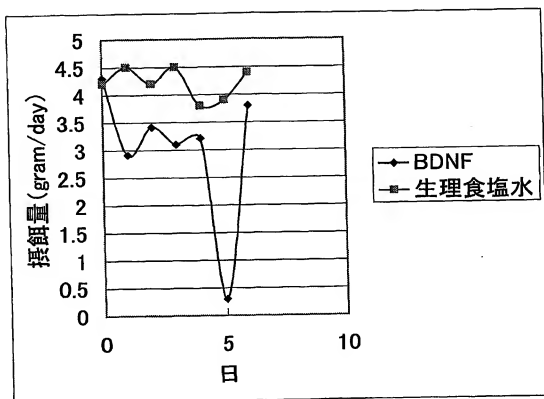
4/5

第4図



5/5

第5図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National application No.

PCT/JP03/12134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ G01N33/53, A61K38/17, A61K45/00, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl.⁷ G01N33/53, A61K38/17, A61K45/00, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Biosis, CA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	RIBASES et al., "Met66 in the BDNF precursor is associated with anorexia nervosa restrictive type", Molecular Psychiatry, August 2003, Vol.8, No.8, pages 745 to 751	1-10, 12
P,X	RIBASES et al., "Met66 in the BDNF precursor is associated with anorexia nervosa restrictive type", American Journal of Medical Genetics, October 2002, Vol.114, No.7, page 739 071	1-10, 12
P,X	NAKAZATO et al., "Decreased levels of serum BDNF in female patients with eating disorders", Biological Psychiatry, August 2003, Vol.54, No.4, pages 485 to 490	1-10, 12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search
28 October, 2003 (28.10.03)

Date of mailing of the international search report
11 November, 2003 (11.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12134

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 8-501313 A (Regeneron Pharmaceuticals, INC.), 13 February, 1996 (13.02.96), In particular, page 13, lines 3 to 18 & WO 94/06455 A & EP 666756 A & DE 69327113 A	1-10, 12
A	WO 94/23736 A (Regeneron Pharmaceuticals, INC.), 27 October, 1994 (27.10.94), Claims; in particular, Claim 3 & AU 6703394 A	1-10, 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/12134

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 11
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Since the extension of "a compound increasing a brain-derived neurotrophic factor" is unknown, no meaningful international search can be made on the invention according to claim 11.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, A61K38/17, A61K45/00, A61P43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, A61K38/17, A61K45/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Biosis, CA

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	RIBASES, et al "Met66 in the BDNF precursor is associated with anorexia nervosa restrictive type" Molecular Psychiatry, Aug. 2003, Vol.8, No.8, p745-751	1-10, 12
PX	RIBASES, et al "Met66 in the BDNF precursor is associated with anorexia nervosa restrictive type" American Journal of Medical Genetics, Oct. 2002, Vol.114, No.7, p739 071	1-10, 12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.10.03

国際調査報告の送付日

11.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵

電話番号 03-3581-1101 内線 3251



C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	NAKAZATO et al, "Decreased levels of serum BDNF in female patients with eating disorders" Biological Psychiatry, Aug. 2003, Vol.54, No.4, p485-490	1-10, 12
A	JP 8-501313 A (リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド) 1996.02.13 特に13頁第3行-18行参照 & WO 94/06455 A & EP 666756 A & DE 69327113 A	1-10, 12
A	WO 94/23736 A (Regeneron Pharmaceuticals, INC.) 1994.10.27 クレーム (特にクレーム3) 参照 & AU 6703394 A	1-10, 12

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☒ 請求の範囲 _____ 11 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
「脳由来神経栄養因子を増加させる化合物」なるものの外延が不明であって、請求の範囲11に係る発明について有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみにについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。